

福井大学生命科学複合研究教育センター平成23年度研究費助成事業
「脳発達プロジェクト研究」

神経細胞内 M_1 受容体量を指標とした幼若マウス中枢神経系の 拘束ストレス応答の解析

研究代表者： 西宗 敦史（医学部・学内講師）

共同研究者： 村松 郁延（医学部・教授）、A.S.M.Anisuzzaman（医学部・特命助教）

概 要	脳の発達過程において、シナプス形成に続く神経伝達物質受容体の機能発現は神経回路の発達上極めて重要なステップとなっている。本研究では、我々が新規に見出した、細胞内 M_1 ムスカリン性アセチルコリン受容体を指標として、幼若期のマウスのストレスに対する中枢性の応答を解析する。これによって、発達期の化学的神経伝達の成熟過程のストレス感受性について理解を深めることを目的とする。
関連キーワード	ムスカリン M_1 受容体、細胞内受容体、Quinuclidinyl benzilate、拘束ストレス、幼若動物

研究の背景および目的

細胞内 M_1 ムスカリン性アセチルコリン受容体は、ラットでは外界のストレスに応答し、劇的にその量が減少する。また老化に伴っても細胞表面の受容体にはるかに先立って激減することから、生体内でストレスに反応するエフェクターの一つとなっている。マウスではラットと比較して遺伝学的な操作が広く行われており、ノックアウト動

物やトランスジェニック動物などの個体レベルでの分子の機能解析に有用なツールが豊富に入手できる。概要で示した目的に加えて、マウスで発達過程の細胞内 M_1 受容体の挙動とストレス応答性を解析することで、ストレス応答の分子機構を解明するための基盤づくりを行う。

研究の内容および成果

我々の先行実験のデータは成体ラットで得られていたため、まずマウス（C57BL/6 ♂）の脳大皮質を用いて細胞内ムスカリン受容体の定量を行った。この結果、5～6週齢を境に急激に受容体量が増大することが判明した（図1）。

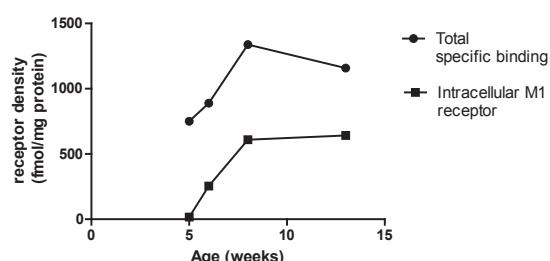


図1. マウス大脳皮質におけるムスカリン受容体の発達と細胞内 M_1 受容体の発現過程

50ml 容量のポリプロピレン製コニカルチューブを用いて拘束ストレスを与えた。チューブには呼吸のために先端部に $\phi 0.8\text{mm}$ の細孔を 50 個あけた。また拘束中はかなりマウスが発汗していたので、不要な体温上昇を防ぐためチューブ全体に

孔を 200 個あけた。穴あけにはミニドリル（サンハヤト MINIDRILL D-3）を AC アダプターを用いて使用した。また拘束中に盛んに排泄するので、尾側に脱脂綿を詰めてスペースの減少と排泄物の散乱防止を実現した。拘束用チューブに一日当たり 2 時間入れて、チューブを飼育ケージ内に静置することで行い、14 日間連続して拘束を与えた。

細胞内ムスカリン受容体の定量には、細胞内外の受容体を両方標識できる脂溶性のトリチウム標識リガンド $[3H]$ -Quinuclidinyl benzilate (QNB) を用い、細胞表面の受容体のみと競合する親水性のリガンド N-methyl scopolamine ($0.1\mu\text{M}$) で競合されて結合しなくなる部分を表面受容体、またアトロピン ($1\mu\text{M}$) で競合されない QNB の結合部位を非特異的リガンド結合部位と定義した。組織をホモゲナイズすると、親水性リガンドの有無による細胞内外の受容体の分別定量が不可能になるため、大脳皮質より約 1mm から 1.5mm 角大の切片を作製し、切片のまま 4°C で 8 時間インキュベートしてリガンドを飽和させた。未結合の過剰なリガンドは、切片をポリスチレン製小試験管内で 45 秒間震盪洗浄して除いた。洗浄後の切片は過剰な水分を除いた後、 0.3M NaOH 溶液を加え、 37°C で完全に溶解するまで保温し、リガンドの定量とタンパク質定量に用いた。

週齢 (週) と ストレス負荷期間 (週)	細胞内 M ₁ 受容体量 (fmol/mg protein)	ムスカリン 受容体総量 (fmol/mg protein)
5 (control)	17	750
5 (3->5 拘束)	590	1400
6 (control)	250	890
6 (3->5 拘束)	690	1400
8 (control)	610	1300
8 (3->5 拘束)	490	1000
13 (control)	640	1200
13 (3->5 拘束)	385	1100

表 1 発達及びストレス負荷に伴う受容体量の変化

8 週齢以降の動物では、我々がラット成体で見出していたのと同様に拘束負荷によって細胞内ムスカリン受容体の減少がみられた。ところが、3 週齢から 5 週齢まで、或いは 4 週齢から 6 週齢まで拘束負荷を与えた場合、細胞内 M₁ 受容体は増加した。拘束負荷は幼若動物に対しては受容体の発現を左右するという点で攪乱要因となるが、成体とは全く異なる反応を示すことが明らかとなった。

以上より、本研究で明らかになった、マウスの細胞内 M₁ 受容体の特性とストレス応答の特徴に

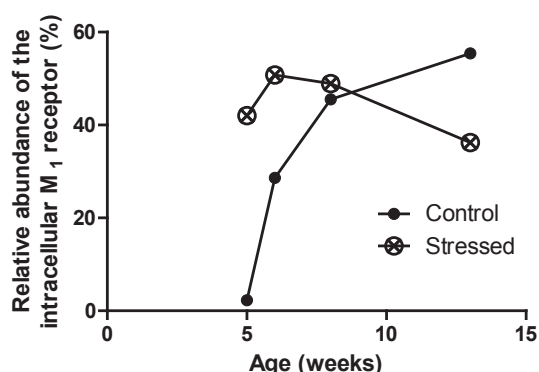


図 2 各週齢における大脳皮質細胞内 M₁ 受容体量と、ストレス負荷時における同受容体量各条件でのムスカリン受容体総量を 100% とした相対値で表示した。

ついてまとめると

- ・細胞内 M₁ は表面の M₁ 受容体の発達に遅れ、生後 5 週以降に急激に増加する。
- ・6 週頃までは拘束ストレス負荷に応答して、細胞内 M₁ 受容体量は増加する。
- ・それ以降は拘束ストレス負荷に応答して、細胞内 M₁ 受容体量は減少するが、ラットのような悉無律的な消失は起こらなかった。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. **Nishimune A**, Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Muramatsu I. Phenotype pharmacology of lower urinary tract $\alpha(1)$ -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 2012;165:1226-34.
2. Kantamneni S, Wilkinson KA, Jaafari N, Ashikaga E, Rocca D, Rubin P, Jacobs SC, **Nishimune A**, Henley JM. Activity-dependent SUMOylation of the brain-specific scaffolding protein GISP. *Biochem Biophys Res Commun*. 409:657-62. 2011.
3. Ikeda T, Anisuzzaman AS, Yoshiki H, Sasaki M, Koshiji T, Uwada J, **Nishimune A**, Itoh H, Muramatsu I. Regional quantification of muscarinic acetylcholine receptors and β -adrenoceptors in human airways. *Br J Pharmacol*. in press
4. Md Anisuzzaman AS, **Nishimune A**, Yoshiki H, Uwada J, Muramatsu I. Influence of tissue integrity on pharmacological phenotypes of muscarinic acetylcholine receptors in the rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther*. 339:186-93. 2011.

5. Uwada J, Anisuzzaman AS, **Nishimune A**, Yoshiki H, Muramatsu I. Intracellular distribution of functional M(1) -muscarinic acetylcholine receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 118:958-67. 2011.
6. Wang MH, Yoshiki H, Anisuzzaman AS, Uwada J, **Nishimune A**, Lee KS, Taniguchi T, Muramatsu I. Re-evaluation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain by a tissue-segment binding assay. *Front Pharmacol*. 2:65. 2011

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 24 年度科学研究費・基盤 (C) 一般・H24～H26・G タンパク質共役型受容体の新規調節因子 CRELD1 の生体内機能の解明 代表 採択・546 万円
山田養蜂場みつばち研究助成基金 老化及びストレス負荷感受性神経細胞内ムスカリン M₁ 受容体に対するローヤルゼリーの保護効果 平成 23 年度 代表 不採択